

## ВЛИЯНИЕ *TOXOPLASMA GONDII* НА ЭКСПРЕССИЮ GFAP, S 100 И ИНДЕКС ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ KI-67 В ТКАНЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КРЫСИНОЙ ГЛИОМЫ

ПАШИНСКАЯ Е.С., СЕМЕНОВ В.М.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2019. – Том 18, №6. – С. 50-58.

## THE EFFECT OF *TOXOPLASMA GONDII* ON THE EXPRESSION OF GFAP, S100 AND THE PROLIFERATIVE ACTIVITY INDEX KI-67 IN TISSUES OF EXPERIMENTAL RAT GLIOMA

PASHINSKAYA E.S., SEMENOV V.M.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2019;18(6):50-58.

### Резюме.

Цель – изучить влияние *Toxoplasma gondii* на экспрессию GFAP, S 100 и индекс пролиферативной активности Ki-67 в тканях экспериментальной крысиной глиомы в зависимости от дозы заражения и срока развития паразита. Опыт проводили на самках крыс линии Wistar. Он состоял из 3 серий. После моделирования опухоли крысиной глиомы C6 in situ подопытных животных разделяли на 18 групп по 10 особей в каждой. Первая серия эксперимента включала животных 1-6 групп, у которых забирали материал на 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 42-е и 49-е сутки развития глиомы. Результаты первой серии использовали в качестве контроля. Во второй серии участвовали самки 7-12 групп, полученные данные которых характеризовали влияние токсоплазмы на исследуемые показатели при инвазии животных в дозе 25 тахизоитов на 1 г массы тела животного (5000 тахизоитов на самку) в зависимости от времени с начала заражения. В третьей серии участвовали крысы 13-18 групп, результаты которых показывали роль токсоплазмы (доза заражения 50 тахизоитов на 1 г массы тела животного, 10000 тахизоитов на самку) в изменении экспрессии GFAP, S 100, пролиферативной активности Ki-67.

Выявлено, что инвазия токсоплазмой в дозе 5000 тахизоитов на крысу вызывает рост пролиферативной активности в опухоли в 1,79-3,25 раза по сравнению с контролем на всех сроках развития паразита (острый и хронический токсоплазмоз).

Заражение в дозе 10000 тахизоитов на животное приводит к увеличению экспрессии GFAP по сравнению с контрольной серией в 1,79-3,19 раза, а по сравнению с серией №2 (заражение 5000 тахизоитов на самку) – в 1,53-3,5 раза на всех сроках развития паразита; повышению экспрессии S 100 в 1,45-6,33 раза по сравнению с контролем и по сравнению со второй серией – в 1,24-5,32 раза; инициирует рост показателя пролиферативной активности Ki-67 по сравнению с контролем в 3,18-7,33 раза, а по сравнению со второй серией – в 1,2-2,25 раза соответственно.

**Ключевые слова:** *Toxoplasma gondii*, GFAP, S 100, Ki-67, крыса, глиома.

### Abstract.

**Objectives.** To study the effect of *Toxoplasma gondii* on the expression of GFAP, S 100 and the proliferative activity index Ki-67 in experimental rat glioma tissues depending on the dose of infection and the term of the parasite development.

**Material and methods.** The experiment was conducted on female Wistar rats and consisted of 3 series. After modelling the tumor of rat glioma C6 in situ experimental animals were divided into 18 groups of 10 individuals each. The first series of the experiment included animals of groups 1-6, from which the material was taken on the 14th, 21st, 28th, 35th, 42nd and the 49th day of glioma development. The results of the first series were used as a control. In the second series, females of groups 7-12 participated, the obtained data of which characterized the effect of *Toxoplasma* on the studied parameters in case of animal invasion at the dose of 25 tachyzoites per 1 g of animal body weight (5000 tachyzoites per female) depending on the time from the beginning of infection. The third series involved rats of groups 13-18, the results

of which showed the role of toxoplasma (infection dose of 50 tachyzoites per 1 g of animal body weight, 10000 tachyzoites per female) in changing the expression of GFAP, S 100, proliferative activity of Ki-67.

Results. It has been revealed that *Toxoplasma* invasion at the dose of 5000 tachyzoites per rat causes 1.79-3.25 times increase of the proliferative activity in the tumor tissue compared to the control at all stages of the parasite development (acute and chronic toxoplasmosis).

Conclusions. The infection dose of 10000 tachyzoites per animal leads to 1.79-3.19 times increase of the expression of GFAP compared with the control series and compared to the series No. 2 (5000 tachyzoites per female infecting) – 1.53-3.5 times in all periods of the parasite development; 1.45-6.33 times increase in the expression of S 100 compared with the control and compared with the second series – 1.24-5.32 times; triggers 3.18-7.33 times growth of the proliferative activity index of Ki-67 compared to the control and in comparison with the second series – 1.2-2.25 times, respectively.

Key words: *Toxoplasma gondii*, GFAP, S 100, Ki-67, rat, glioma.

Токсоплазмоз – это паразитарная инвазия, которая характерна для животных и человека. Она может сопровождаться развитием лимфаденита, гепатита, менингоэнцефалита, пневмонии, миокардита, миозита [1]. На данный момент показатель инфицированности населения токсоплазмозом чрезвычайно высок. В Европе и Северной Америке он составляет от 25 до 50%; а в странах Африки, Южной и Латинской Америки достигает 90%.

Известно, что токсоплазмоз представляет опасность для беременных женщин и лиц со сниженным иммунитетом [2].

При заражении во время беременности может происходить внутриутробное инфицирование плода с самопроизвольным прерыванием беременности, мертворождением или формированием эмбрио- и фетопатий [2].

При инвазии лиц со сниженным иммунитетом заболевание приобретает тяжелое манифестное течение. Распространяясь лимфогенным и гематогенным путями, паразит попадает во внутренние органы и оседает в них интра- и экстрацеллюлярно. После диссеминации споровик образует тканевые цисты, вызывая состояние латентно текущей инвазии. Чаще всего токсоплазма поражает центральную нервную систему, в которой наблюдаются очаговые воспалительные явления, циркуляторные нарушения, связанные с васкулитом сосудов мозга, обструкция ликворных путей и, как итог – гидро- и микроцефалия [3].

Известно, что *T. gondii* способна влиять на работу более тысячи генов человека, ответственных за нормальные процессы клеточного деления, апоптоз, уничтожение или исправление «некачественных» клеток [4].

Показано, что *Toxoplasma gondii* взаимодействует с иммунной системой организма

хозяина, вызывая локальный иммунный ответ. Итогом такого влияния может стать рост уровня нейромодуляторов. Известно, что у человека избыток нейромодуляторов приводит к психозам, проявления которых практически не отличаются от симптомов шизофрении [2, 3]. Кроме того, паразит при механическом, химическом воздействии способен вызвать воспалительные процессы в головном мозге, которые могут привести к выраженным патологическим изменениям [2, 3].

Одной из причин смертности среди онкологических пациентов являются злокачественные опухоли головного мозга. Самая большая группа новообразований объединяет нейроэктодермальные опухоли. Наибольшую долю среди опухолей головного мозга имеют глиальные опухоли (56,4% – среди мужчин и 37,4% – среди женщин) [5].

Одним из основных маркеров повреждения центральной нервной системы (ЦНС) является глиальный фибриллярный кислый протеин (GFAP). GFAP является членом семейства белков цитоскелета и основным промежуточным филаментом зрелых астроцитов ЦНС. GFAP не обнаруживается за пределами ЦНС, так как является высокоспецифичным белком мозга. Известно, что повышение уровня GFAP наблюдается после травматического повреждения мозга, генетического нарушения или инсульта. Изменение экспрессии GFAP может служить маркером тяжести повреждения и прогностическим фактором в отношении исхода ситуации [5].

Специфическим белком астроцитарной глии, способным связывать кальций, является S-100. Увеличение концентрации S-100 в спинномозговой жидкости и плазме крови является маркером повреждения головного мозга при субарахноидальном кровоизлиянии, церебральном

инфаркте у пациентов, оперированных в условиях искусственного кровообращения. Медленный темп снижения концентрации S-100 в послеоперационный период показывает степень возникших осложнений и повреждений клеток мозга [5].

Ki-67 – это маркер пролиферативной активности опухолевой клетки. Данный параметр оценивается в процентах и показывает, сколько процентов опухолевых клеток активно делится. Также Ki-67 является фактором прогноза течения опухолевого заболевания и ответа опухоли на химиотерапевтическое лечение [5].

На данный момент не изучено, может ли токсоплазма оказывать влияние на экспрессию GFAP, S 100 и изменение индекса пролиферативной Ki-67 активности.

Цель работы – изучить влияние *Toxoplasma gondii* на экспрессию GFAP, S 100 и индекс пролиферативной активности Ki-67 в тканях экспериментальной крысиной глиомы в зависимости от дозы заражения и срока развития паразита.

## Материал и методы

В эксперименте использовали 180 самок крыс линии Wistar массой 180-200 г, которые в течение двух недель до начала проходили карантин. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с рекомендациями Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and Other Scientific Purposes: Strasbourg, Council of Europe, 51 pp; 18.03.1986), Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 (Council Directive on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animal Used for Experimental and Other Scientific Purposes), рекомендациями FELASA Working Group Report (1994-1996), ТКП 125-2008 и методическими указаниями «Положение о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и педагогическом процессе УО «Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет», и мерами по реализации требований биомедицинской этики», 2010.

Подопытных животных разделяли на 18 групп по 10 особей в каждой для проведения 3 серий эксперимента. Экспериментальную модель

глиомы C6 in situ воспроизводили у животных всех групп. Для этого путем инъекции вводили опухолевые клетки крысиной глиомы C6 во внутреннюю область бедра в концентрации  $10 \times 10^6$  подкожно. Параллельно с этим проводили инъекцию дексаметазона в дозировке 0,001 мл (4,0 мг/мл) на 1 грамм веса животного внутримышечно. Инъекции дексаметазона выполняли ежедневно в течение 7-ми суток после перевивки, а с 8-ых суток – с кратностью через сутки в течение 14-ти суток.

Забой животных осуществляли путем дислокации шейных позвонков под воздействием эфирного наркоза.

Опухолевый материал животных первой серии эксперимента служил контролем для получения результатов на различных сроках развития опухоли. Забор материала проводили на 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 42-е и 49-е сутки [6].

Опухолевый материал крыс второй и третьей серии использовали для изучения влияния *T. gondii* на изменение нейроспецифических глиомных показателей (GFAP, S 100) и индекса пролиферативной активности (Ki 67). Самок обеих серий заражали инвазионной культурой токсоплазм на 7-е сутки после введения опухолевых клеток крысиной глиомы C6: крыс второй серии - в дозе 25 тахизоитов на 1 г массы тела животного (5000 тахизоитов на самку), а крыс третьей серии – в дозе 50 тахизоитов на 1 г массы тела животного (10000 тахизоитов на самку).

Животных выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под воздействием эфирного наркоза по графику: на 14-е сутки развития глиомы (7-е сутки после инвазии), 21-е сутки развития опухоли (14-е сутки после инвазии), 28-е сутки развития опухоли (21-е сутки после инвазии), 35-е сутки развития глиомы (28-е сутки после инвазии), 42-е сутки развития опухоли (35-е сутки после инвазии) и 49-е сутки развития глиомы (42-е сутки после инвазии) и проводили забор материала (опухоль, печень, селезенка, легкие, головной мозг).

Биоптаты, полученные от всех экспериментальных крыс, фиксировали в забуференном формалине на 24 часа, после чего готовили парафиновые блоки [6]. Далее получали гистологические препараты для обзорного изучения, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

Изменения нейроспецифических глиомных показателей (GFAP, S 100) и индекса пролиферативной активности (Ki-67) в зависимости

от сроков развития инвазии проводили после изготовления серийных парафиновых срезов с использованием специализированных стекол, обработанных поли-L-лизинном. Для демаскировки антигенов применяли буфер Wuhan Elabscience Biotechnology Incorporated Company, а для иммуногистохимической реакции – систему визуализации 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System (with DAB Solution, Wuhan Elabscience Biotechnology Incorporated Company, Китай, E-IR-R213).

Изменения иммуногистохимических показателей изучали при использовании светового микроскопа Leica DM 2500 в непересекающихся полях зрения в 1000 клеток каждого среза. Оценивали локализацию окрашивания таких внутриклеточных компонентов, как ядро, цитоплазма и/или плазмолема; учитывали интенсивность окрашивания в области с максимальной экспрессией и производили расчет процента окрашенных клеток [6]. Экспрессию GFAP, S 100 в материале считали отрицательной при полном отсутствии окрашивания цитоплазмы или при окрашивании менее 10% клеток (0 баллов); при окрашивании цитоплазмы от 10 до 25% клеток экспрессию оценивали в 1 балл (1+); в 2 балла (2+) – при окрашивании цитоплазмы от 26 до 50% клеток; в 3 балла (3+) – более чем у 50% клеток.

Показатель пролиферативной активности опухоли (Ki-67) рассчитывали как процент положительных ядер в клетках опухоли. Пролиферативную активность считали полностью отрицательной, если в ткани новообразования отсутствовала ядерная экспрессия с антителами или количество окрашенных ядер было менее 10%; положительной – при окраске более 10% клеток, оцениваемых в области максимальной экспрессии маркера; высокой пролиферативную активность считали, если экспрессия Ki-67 фиксировалась в более чем 40% клеток; при экспрессии Ki-67 в менее 40% клеток пролиферативную активность оценивали как низкую [6].

Расчет доли окрашенных клеток (Immunoreactivity, IRS) осуществляли путем суммирования баллов окрашенных клеток и интенсивности их окраски. Позитивным считали результат при суммарном балле более или равном 3 [6].

Различия между группами оценивали по критерию Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, Вилкоксона и считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.

## Результаты

Макроскопически, при заборе опухолей на 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 42-е сутки в первой серии эксперимента выявлено, что они развились в месте инъекции опухолевой культуры С6. Новообразования чаще были овальной формы, с неровными краями, размером от 3 до 6 см<sup>3</sup>. По консистенции – плотные, упругие, красного цвета. Отмечалась хорошо развитая кровеносно-сосудистая система, связанная с новообразованием. При вскрытии опухоли состояли из 2-3 полостей, заполненных либо прозрачной светло красной жидкостью, либо рыхлым тканевым содержимым.

Гистологически: (14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 42-е сутки забора материала) выявлено, что опухоль была солидного строения, представлена преимущественно полиморфными опухолевыми клетками с фигурами митозов. Межклеточное вещество представлено нейропилем. В опухоли встречались некрозы, пролиферация сосудов. Гистологическое заключение: глиобластома (глиома).

Макро- и гистологический анализ печени, селезенки, легких, головного мозга, забранных у крыс первой серии эксперимента, изменений не выявил.

При макроскопическом и гистологическом анализе глиомы животных второй и третьей серии отличий от опухолей первой серии не выявлено.

Гистологическая картина биоптатов остальных органов, забранных у животных второй и третьей серии, была сходной между собой.

В печени кровенаполнение синусоидных капилляров варьировало от слабого до очагового полнокровия. Наблюдалось очаговое полнокровие центральных вен. Отдельные сосуды были окружены незначительными скоплениями фибробластов. Наблюдались признаки зернистой и гидropической дистрофий. В паренхиме встречались периваскулярные лимфоидные узелки

В срезах селезенки отмечалось умеренное полнокровие красной пульпы. Лимфоидные узелки в различной степени были увеличены, отдельные из них сливались друг с другом. В большинстве узелков было выраженное просветление реактивных центров. Стенки центральных артерий фолликулов были не изменены.

В легких наблюдалось неравномерное кровенаполнение сосудов с преобладанием венознокapиллярного полнокровия, эритросты, гемолиз эритроцитов. Межалъвеоларные перегородки

были резко утолщены в результате клеточной инфильтрации. Стенки сосудов утолщены, разрыхлены, разволокнены за счёт периваскулярного отёка. Вокруг большинства сосудов располагались периваскулярные лимфоидные узелки. Воздушность лёгочной ткани на всей площади срезов была резко снижена. Бронхи были со слабо выраженным отёком и умеренно выраженной лейкоцитарной инфильтрацией и инфильтрацией полиморфными клетками. Просветы бронхов содержали слущенный эпителий в виде отдельных клеток, лейкоцитов, нити фибрина.

В срезах головного мозга выявлено следующее: в веществе мозга отмечались неравномерное кровенаполнение сосудов, очаговые единичные милиарные кровоизлияния и скопления клеток микроглии. Выявлен неравномерно выраженный отёк вещества мозга, который характеризовался просветлением периваскулярных и перичеселлюлярных пространств. Наблюдались дистрофические изменения нейроцитов.

Иммуногистохимические исследования проводили только в опухолевых образцах, так как материала для ИГХ-исследования в остальных срезах забранных органов в трех сериях проведенного эксперимента не обнаружено.

В тканях новообразований первой серии эксперимента, полученных на 14-е, 21-е, 28-е, 35-е, 42-е и 49-е сутки после введения опухолевой культуры С6, экспрессия GFAP составила: к 14-м суткам – 1+ (13,46%; 95% ДИ : 11,48-15,43; IRS=5); к 21-м суткам – 1+ (18,24%; 95% ДИ : 16,10-20,37; IRS=5); к 28-м суткам – 1+ (12,92%; 95% ДИ : 11,87-13,96; IRS=5); на 35-е сутки – 1+ (14,43%; 95% ДИ : 13,39-15,46; IRS=5); на 42-е и 49-е сутки по 1+ (15,34%; 95% ДИ : 14,24-16,43; IRS=5) и (14,25%; 95% ДИ : 12,98-15,51; IRS=5). Достоверное отличие экспрессии наблюдалось при сравнении результатов, полученных на 14-е и 21-е сутки. Экспрессия GFAP к 21-м суткам развития глиомы превышала данные, зафиксированные на 14-е сутки, в 1,35 раза ( $p=0,007$ ).

Показатели экспрессии S 100 в биоптатах контрольной серии к 14-м суткам составила 1+ (13,93%; 95% ДИ : 11,48-15,43; IRS=5); к 21-м суткам – 1+ (19,23%; 95% ДИ : 17,88-20,57; IRS=5); к 28-м суткам – 1+ (13,89%; 95% ДИ : 12,88-14,89; IRS=5); на 35-е сутки – 1+ (15,37%; 95% ДИ : 13,94-16,79; IRS=5); на 42-е сутки – 1+ (16,59%; 95% ДИ : 15,35-17,82; IRS=5) и 49-е сутки (13,62%; 95% ДИ : 10,66-16,57; IRS=5). Рост экспрессии S 100 отмечался на 21-е сутки

в 1,38 раза ( $p=0,0003$ ) и на 42-е сутки в 1,19 раза ( $p=0,007$ ).

Результаты расчета индекса пролиферативной активности опухоли Ki-67 были следующими: на 14-е сутки – 27,63% (95% ДИ : 25,23-30,02); к 21-м суткам – 26,93% (95% ДИ : 23,74-30,11); к 28-м суткам – 25,66% (95% ДИ : 22,56-28,75); на 35-е сутки – 13,78% (95% ДИ : 12,17-15,38); на 42-е сутки – 13,81% (95% ДИ : 11,57-16,04) и 49-е сутки – 12,71% (95% ДИ : 11,50-13,91). Отмечалось достоверное снижение индекса пролиферативной активности с увеличением срока развития глиомы в 2-2,17 раза ( $p=0,001$ ).

Экспрессия GFAP в образцах опухолевой ткани животных второй серии к 7-м суткам развития токсоплазмы составила 1+ (15,69%; 95% ДИ : 12,40-18,97; IRS=5); к 14-м суткам – 1+ (17,46%; 95% ДИ : 15,31-19,60; IRS=5); к 21-м суткам – 1+ (16,46%; 95% ДИ : 13,52-19,39; IRS=5); на 28-е сутки – 1+ (14,48%; 95% ДИ : 13,34-15,61; IRS=5); к 35-м суткам развития заболевания – 1+ (15,65%; 95% ДИ : 14,58-16,71; IRS=5), а к 42-м суткам – 1+ (14,58%; 95% ДИ : 15,06-17,33; IRS=5). Достоверных отличий группой контроля не выявлено.

Экспрессия S 100 в биоптатах, полученных при проведении серии номер два, к 7-м суткам развития паразита была на уровне 1+ (15,69%; 95% ДИ : 12,40-18,97; IRS=5); к 14-м суткам – 1+ (18,57%; 95% ДИ : 17,23-19,90; IRS=5); к 21-м суткам – 1+ (14,07%; 95% ДИ : 13,15-14,98; IRS=5); на 28-е сутки – 1+ (15,25%; 95% ДИ : 14,16-16,33; IRS=5); на 35-е сутки – 1+ (16,40%; 95% ДИ : 15,45-17,34; IRS=5) и 42-е сутки (16,19%; 95% ДИ : 14,91-17,46; IRS=5). Достоверных отличий группой контроля выявлено не было.

Индекс пролиферативной активности опухоли (Ki-67) был на следующем уровне: на 7-е сутки после инвазии (14-е сутки развития опухоли) – 49,73% (95% ДИ : 45,42-54,03); к 14-м суткам развития паразита (21-е сутки развития опухоли) – 72,17% (95% ДИ : 70,62-73,71); к 21-м суткам (28-е сутки развития опухоли) – 43,25% (95% ДИ : 40,82-45,67); на 28-е сутки (35-е сутки развития опухоли) – 40,97% (95% ДИ : 39,79-42,14); на 35-е сутки после заражения (42-е сутки развития опухоли) – 41,70% (95% ДИ : 40,14-43,25) и 42-е сутки после инвазии (49-е сутки развития опухоли) – 41,32% (95% ДИ : 39,59-43,04). Максимальная активность пролиферации клеток отмечена на 7-е и 14-е сутки после заражения, а затем индекс пролиферативной активности снижался, но

достоверно превышал контрольные результаты.

При сравнении данных первой серии (контроль), полученных на 14-е сутки развития опухоли, с результатами второй серии (забор материала на 7-е сутки после инвазии, 14-е сутки развития глиомы) выявлено, что наблюдался рост пролиферации в материале животных второй опытной серии в 1,79 раза ( $p=0,005$ ); сравнение результатов, полученных на 21-е сутки развития опухоли (контроль), с данными, полученными на 14-е сутки развития токсоплазм (21-е сутки развития опухоли, вторая серия), показало рост пролиферации в 2,67 раза ( $p=0,005$ ). Индекс Ki-67 в материале второй серии на 21-е сутки после заражения (28-е сутки развития опухоли) был выше в 1,68 раза ( $p=0,005$ ) показателей контрольной серии (забор на 28-е сутки развития опухоли); на 28-е сутки после инвазии (35-е сутки развития глиомы) – в 2,97 раза ( $p=0,005$ ); к 35-м суткам после заражения животных токсоплазмами (42-е сутки развития глиомы) – в 3,01 раза ( $p=0,005$ ); на 42-е сутки развития паразита (49-е сутки развития опухоли) – в 3,25 раза ( $p=0,005$ ).

Экспрессия GFAP в образцах опухолевой ткани третьей серии к 7-м суткам развития инвазии составила 1+ (24,10%; 95% ДИ : 15,50-20,70; IRS=5); к 14-м суткам – 3+ (53,35%; 95% ДИ : 40,95-65,75; IRS=5); к 21-м суткам – 2+ (30,33%; 95% ДИ : 26,16-34,50; IRS=5); на 28-е сутки – 2+ (37,75%; 95% ДИ : 26,68-48,82; IRS=5); к 35-м суткам развития заболевания – 2+ (46,06%; 95% ДИ : 42,96-49,16; IRS=5), а к 42-м суткам – 2+ (45,29%; 95% ДИ : 40,19-50,39; IRS=5).

При анализе экспрессии GFAP в зависимости от срока развития инвазии выявлено, что в сравнении с данными, полученными на 7-е сутки после заражения, показатели, зафиксированные на 14-е сутки развития паразита, были выше в 2,21 раза ( $p=0,0050$ ); на 21-е сутки – в 1,25 раза ( $p=0,0050$ ) по сравнению с 7-ми сутками после заражения; на 28-е сутки – в 1,56 раза ( $p=0,0050$ ); к 35-м суткам – в 1,91 раза ( $p=0,0050$ ); к 42-м суткам – в 1,87 раза ( $p=0,0050$ ).

Кроме того, сравнение с первой серией (контроль) показало, что экспрессия GFAP в биоптатах третьей серии к 14-м суткам развития опухоли (7-е сутки после инвазии) была выше в 1,79 раза ( $p=0,0006$ ); к 21-м суткам развития опухоли (14-е сутки после заражения) – в 2,92 раза ( $p=0,0002$ ); к 28-м суткам (21-е сутки после инвазии) – в 2,34 ( $p=0,0002$ ); на 35-е сутки (28-е сутки после заражения) – в 3,19; на 42-е и 49-е сутки

(35-е и 42-е сутки после инвазии) – в 3 и в 3,17 раза соответственно ( $p=0,0002$ ).

Анализ результатов путем сравнения данных второй и третьей серии показал, что экспрессия GFAP в биоптатах третьей серии к 14-м суткам развития опухоли (7-е сутки после инвазии) была выше в 1,53 раза ( $p=0,005$ ) экспрессии GFAP в материале второй серии, забранном на таком же сроке развития опухоли (7-е сутки после инвазии); к 21-м суткам развития опухоли (14-е сутки после заражения) – в 3,05 раза ( $p=0,0002$ ); к 28-м суткам (21-е сутки после инвазии) – в 1,84 ( $p=0,0002$ ); на 35-е сутки (28-е сутки после заражения) – в 2,60 ( $p=0,0003$ ); на 42-е и 49-е сутки (35-е и 42-е сутки после инвазии) – в 2,94 и в 2,79 раза соответственно ( $p=0,0002$ ).

Экспрессия S 100 в биоптатах третьей серии к 7-м суткам развития паразита была на уровне 1+ (20,25%; 95% ДИ : 17,84-22,66; IRS=5); к 14-м суткам – 3+ (77,51%; 95% ДИ : 66,37-88,65; IRS=5); к 21-м суткам – 3+ (55,45%; 95% ДИ : 44,26-66,64; IRS=5); на 28-е сутки – 3+ (59,01%; 95% ДИ : 53,01-65,01; IRS=5); на 35-е сутки – 3+ (78,05%; 95% ДИ : 67,66-88,44; IRS=5) и 42-е сутки (86,27%; 95% ДИ : 77,52-95,02; IRS=5).

При анализе экспрессии S 100 третьей серии в зависимости от срока развития инвазии выявлено, что в сравнении с данными, полученными на 7-е сутки после заражения, показатели, зафиксированные на 14-е сутки развития паразита, выше 3,82 раза ( $p=0,0050$ ); на 21-е сутки – в 2,73 раза ( $p=0,0050$ ), сравнение с 7-ми сутками после заражения; на 28-е сутки – в 2,91 раза ( $p=0,0050$ ); к 35-м суткам – в 3,85 раза ( $p=0,0050$ ); к 42-м суткам – в 4,26 раза ( $p=0,0050$ ).

Сравнение с контрольной группой показало, что экспрессия S 100 в биоптатах третьей серии к 14-м суткам развития опухоли (7-е сутки после инвазии) была выше в 1,45 раза ( $p=0,0005$ ); к 21-м суткам развития опухоли (14-е сутки после заражения) – в 4,03 раза ( $p=0,0002$ ); к 28-м суткам (21-е сутки после инвазии) – в 3,99 ( $p=0,0002$ ); на 35-е сутки (28-е сутки после заражения) – в 3 раза; на 42-е и 49-е сутки (35-е и 42-е сутки после инвазии) – в 4,7 и в 6,33 раза соответственно ( $p=0,0002$ ).

В свою очередь, экспрессия S 100 в биоптатах третьей серии к 14-м суткам развития опухоли (7-е сутки после инвазии) была выше показателей второй серии в 1,24 раза ( $p=0,013$ , забор на 7-е сутки после инвазии); к 21-м суткам развития опухоли (14-е сутки после заражения) –

в 4,17 раза ( $p=0,0002$ ); к 28-м суткам (21-е сутки после инвазии) – в 3,94 ( $p=0,0002$ ); на 35-е сутки (28-е сутки после заражения) – в 3,86 ( $p=0,0002$ ); на 42-е и 49-е сутки (35-е и 42-е сутки после инвазии) – в 4,76 и в 5,32 раза соответственно ( $p=0,0002$ ).

Индекс пролиферативной активности опухоли (Ki 67) в третьей серии был на следующем уровне: на 7-е сутки после инвазии (14-е сутки развития опухоли) – 87,95% (95% ДИ : 83,78-92,12); к 14-м суткам развития паразита (21-е сутки развития опухоли) – 87,05% (95% ДИ : 81,41-92,69); к 21-м суткам (28-е сутки развития опухоли) – 88,15% (95% ДИ : 72,00-99,30); на 28-е сутки (35-е сутки развития опухоли) – 84,82% (95% ДИ : 77,75-91,89); на 35-е сутки после заражения (42-е сутки развития опухоли) – 89,57% (95% ДИ : 85,60-93,54) и 42-е сутки после инвазии (49-е сутки развития опухоли) – 93,19% (95% ДИ : 89,47-96,91).

При сравнении данных в зависимости от срока развития инвазии выявлено, что результаты достоверно не отличаются между собой.

Сравнение данных первой серии (контроль), полученных на 14-е сутки развития опухоли, с результатами третьей серии (забор материала на 7-е сутки после инвазии, 14-е сутки развития глиомы) показало, что наблюдался рост процента пролиферативной активности в материале животных опытной третьей серии в 3,18 раза ( $p=0,002$ ); сравнение результатов, полученных на 21-е сутки развития опухоли (контроль), с данными, полученными на 14-е сутки развития токсоплазм (21-е сутки развития опухоли, третья серия), показало рост пролиферации в 3,23 раза ( $p=0,002$ ). Индекс Ki-67 в материале третьей серии на 21-е сутки после заражения (28-е сутки развития опухоли) был выше в 3,43 раза ( $p=0,002$ ) показателей контроля (забор на 28-е сутки развития опухоли); на 28-е сутки после инвазии (35-е сутки развития глиомы) – в 6,15 раза ( $p=0,002$ ); к 35-м суткам после заражения животных токсоплазмами (42-е сутки развития глиомы) – в 6,48 раза ( $p=0,002$ ); на 42-е сутки развития паразита (49-е сутки развития опухоли) – в 7,33 раза ( $p=0,002$ ).

Выявлено, что в материале третьей серии к 14-м суткам развития опухоли (7-е сутки после инвазии), пролиферативная активность превышала показатель Ki-67 второй серии в 1,77 раза ( $p=0,0002$ , забор на 7-е сутки после инвазии); к 21-м суткам развития опухоли (14-е сутки после заражения) – в 1,2 раза ( $p=0,0003$ ); к 28-м суткам

(21-е сутки после инвазии) – в 2,03 ( $p=0,0502$ ); на 35-е сутки (28-е сутки после заражения) – в 2,07 ( $p=0,0002$ ); на 42-е и 49-е сутки (35-е и 42-е сутки после инвазии) – в 2,14 и в 2,25 раза соответственно ( $p=0,0002$ ).

## Обсуждение

В настоящее время многих ученых и врачей интересует роль биотических факторов среды в формировании различных заболеваний. Известно, что ежедневно в организме происходят различные трансформации на клеточном уровне: возможно изменение клеток по форме, размеру, строению; нарушение их компонентов; увеличение числа фигур митоза и т.д. В норме здоровый организм уничтожает такие поврежденные клетки [6, 7]. Однако при механических, химических и генотоксических воздействиях, а также нарушениях иммунной защиты может произойти запуск механизма бластомогенеза, характеризующегося превращением одной опухолевой клетки в опухолевую ткань [7, 8].

Известно, что паразиты при инвазии хозяина могут оказывать механическое, химическое, мутагенное, цитотоксическое, генотоксическое и эмбриотоксическое воздействия [8-10]. Но большинство публикаций посвящено канцерогенному воздействию гельминтов [8-11]. Роль токсоплазм в процессе бластомогенеза не изучена.

## Заключение

На примере рассмотренных взаимоотношений между хозяином (опухоль) и паразитом, исходя из полученных нами результатов, можно сделать выводы, что:

1. Инвазия токсоплазмой в дозе 5000 тахизоитов на крысу вызывает рост пролиферативной активности в опухолевой ткани в 1,79-3,25 раза по сравнению с контролем на всех сроках развития паразита (острый и хронический токсоплазмоз).

2. Заражение в дозе 10000 тахизоитов на животное приводит к увеличению экспрессии GFAP по сравнению с контрольной серией в 1,79-3,19 раза, а по сравнению с серией номер два (заражение 5000 тахизоитов на самку) – в 1,53-3,5 раза на всех сроках развития паразита; повышению экспрессии S 100 в 1,45-6,33 раза по сравнению с контролем и по сравнению со второй серией – в 1,24 раза - 5,32 раза; инициирует рост проли-

феративной активности Ki-67 по сравнению с контролем в 3,18-7,33 раза, а по сравнению со второй серией – в 1,2-2,25 раза соответственно.

Таким образом, установлено негативное воздействие токсоплазм на экспрессию глиального фибриллярного кислого белка (GFAP) и белка астроцитарной глии S-100, что, в свою очередь, говорит о нарушении структуры и функции цитоскелета, снижении механической прочности клеток, за счет чего могут изменяться их функции. Отмечается также рост уровня пролиферативной активности в тканях глиомы во время паразитирования токсоплазмы, что показывает четкое blastogenic воздействие паразита.

## Литература

1. Токсоплазмоз головного мозга у больных ВИЧ-инфекцией в городе Оренбурге / Н. Р. Михайлова [и др.] // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. – 2015. – № 1. – С. 138–144.
2. Клинические и морфологические особенности пороков развития у детей с врожденными цитомегаловирусной и токсоплазменной инфекциями / Л. Ю. Барычева [и др.] // Рос. вестн. перинатологии и педиатрии. – 2015. – Т. 60, № 3. – С. 50–57.
3. Toxoplasma modulates signature pathways of human epilepsy Neurodegeneration & Cancer / H. M. Ngo [et al.] // Sci. Rep. – 2017 Sep. – Vol. 7, N 1. – P. 11496.
4. Toxoplasma gondii modulates the host cell responses: an overview of apoptosis pathways / N. Mammari [et al.] // Biomed. Res. Int. – 2019 Apr. – Vol. 2019. – P. 6152489.
5. Колотов, К. А. Иммуногистохимические особенности глиальных опухолей головного мозга / К. А. Колотов, О. В. Машковцев, Б. Н. Бейн // Мед. альм. – 2012. – № 4. – С. 66–69.
6. Иммуногистохимические методы исследования новообразований различного генеза : инструкция по применению № 160-1110 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 11.02.2011 г. / Э. А. Надыров [и др.]. – Гомель, 2011. – 20 с.
7. Морфологические и физиологические особенности раковых клеток у млекопитающих / В. В. Побяржин [и др.] // Вестн. ВГМУ. – 2016. – Т. 15, № 6. – С. 28–40.
8. Генные механизмы возникновения раковых опухолей / В. М. Семенов [и др.] // Здравоохранение. – 2017. – № 7. – С. 38–47.
9. Shokeir, A. A. Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment / A. A. Shokeir // BJU Int. – 2004 Jan. – Vol. 93, N 2. – P. 216–220.
10. Infection with the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini* / J. M. Smout [et al.] // Mol. Biosyst. – 2011 May. – Vol. 7, N 5. – P. 1367–1375.
11. Blaszkowska, J. Disturbance of mouse pregnancy after injection of *Ascaris* homogenate during early organogenesis / J. Blaszkowska // Wiad. Parazytol. – 2000. – Vol. 46, N 3. – P. 369–378.

Поступила 14.10.2019 г.  
Принята в печать 27.11.2019 г.

## References

1. Mikhaylova NR, Kalinina TN, Tuchkov DYU, Losin EI, Abakumov GG. Toxoplasmosis of the brain in patients with HIV infection in the city of Orenburg. Vestn Orenburg Gos Un-ta. 2015;(1):138-44. (In Russ.)
2. Barycheva LYU, Golubeva MV, Kabulova MA, Kostornaya IV. Clinical and morphological features of malformations in children with congenital cytomegalovirus and toxoplasma infections. Ros Vestn Perinatologii i Pediatrii. 2015;60(3):50-7. (In Russ.)
3. Ngô HM, Zhou Y, Lorenzi H, Wang K, Kim TK, Zhou Y, et al. Toxoplasma modulates signature pathways of human epilepsy Neurodegeneration & Cancer. Sci Rep. 2017 Sep;7(1):11496. doi: 10.1038/s41598-017-10675-6
4. Mammari N, Halabi M, Yaacoub S, Chlala H, Dardé ML, Courtioux B. Toxoplasma gondii modulates the host cell responses: an overview of apoptosis pathways. Biomed Res Int. 2019 Apr;2019:6152489. doi: 10.1155/2019/6152489
5. Kolotov KA, Mashkovtsev OV, Beyn BN. Immunohistochemical features of glial brain tumors. Med Al'm. 2012;(4):66-9. (In Russ.)
6. Nadyrov EA, Rogov YuI, Dubrovskiy ACh, Voropaev EV, Achinovich SL, Krylov AYU, i dr. Immunohistochemical methods for the study of neoplasms of various origins: instruktsiia po primeneniiu № 160-1110: utv M-vom zdravookhraneniia Resp Belarus' 11.02.2011 g. GomeI', RB; 2011. 20 p. (In Russ.)
7. Pobyarzhin VV, Pashinskaya ES, Semenov VM, Dmitrachenko TI, Shlyakhtunov EA. Morphological and physiological characteristics of cancer cells in mammals. Vestn VGMU. 2016;15(6):28-40. (In Russ.)
8. Semenov VM, Pashinskaya ES, Pobyarzhin VV, Subbotina IA, Shlyakhtunov EA. Gene mechanisms of cancer. Zdravookhranenie. 2017;(7):38-47. (In Russ.)
9. Shokeir AA. Squamous cell carcinoma of the bladder: pathology, diagnosis and treatment. BJU Int. 2004 Jan;93(2):216-20. doi: 10.1111/j.1464-410x.2004.04588.x
10. Smout MJ, Sripa B, Laha T, Mulvenna J, Gasser RB, Young ND, et al. Infection with the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini*. Mol Biosyst. 2011 May;7(5):1367-75. doi: 10.1039/c0mb00295j
11. Blaszkowska J. Disturbance of mouse pregnancy after injection of *Ascaris* homogenate during early organogenesis. Wiad Parazytol. 2000;46(3):369-78.

Submitted 14.10.2019  
Accepted 27.11.2019



**Сведения об авторах:**

Пашинская Е.С. – к.б.н., доцент, докторант кафедры инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет;

Семенов В.М. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

**Information about authors:**

*Pashinskaya E.S. – Candidate of Biological Sciences, associate professor, doctoral candidate of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University;*

*Semenov V.M. – Doctor of Medical Sciences, professor, head of the Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining, Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University.*

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 210009, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, кафедра инфекционных болезней с курсом ФПК и ПК. E-mail: paschinskaya.cat@yandex.ru – Пашинская Екатерина Сергеевна.

**Correspondence address:** Republic of Belarus, 210009, Vitebsk, 27 Frunze ave., Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Chair of Infectious Diseases with the course of the Faculty for Advanced Training & Retraining. E-mail: paschinskaya.cat@yandex.ru – Ekaterina S. Pashinskaya.